

胶原诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎模型病理特点的比较

施佳君, 陈方明, 马全鑫, 陈 诚, 陈姣姣, 郁 晨, 陈民利*

(浙江中医药大学比较医学研究所动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨牛 II 型胶原(CII)诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎(RA)模型的病症表现与病理特点的差异性。**方法** 采用尾根部皮内注射与 CFA 混合液进行首次免疫,14 d 时注射牛 II 型胶原(CII)与弗氏完全佐剂(IFA)混合液加强免疫,建立 Wistar 和 Lewis 大鼠 RA 模型,观察 Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组发病情况,测定足肿胀度和血清抗 CII 抗体效价水平,在第 12 周进行足趾形态和组织的病理学检查,测定踝关节滑膜 VEGF、IL-6、IL-10 和 IL-17A 的表达。**结果** 胶原诱导后,Wistar 与 Lewis 大鼠分别在第 10 天和 14 天出现后足肿胀,第 21 天和 24 天达到高峰,血清抗 CII 抗体效价第 3 周后显著升高($P < 0.01$),关节炎指数(AI)明显升高($P < 0.01$);Wistar-RA 组的成模率 80%,第 5 周足肿胀消退并进入平缓期,Lewis-RA 组的成模率 100%,第 7 周足肿胀消退并进入平缓期;在 12 周时两模型组均发现关节严重软骨侵蚀、滑膜增生以及炎症细胞浸润,关节滑膜血管新生和血管翳形成,后肢股骨和胫骨骨密度明显降低($P < 0.01$),关节滑膜中 VEGF、IL-6、IL-17A 表达显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),IL-10 表达明显下降($P < 0.01$)。与 Wistar-RA 组比较,Lewis-RA 组足容积和足掌厚度增长持续时间较长,AI 高于 Wistar-RA 组,滑膜血管新生和血管翳形成更明显,踝关节滑膜 VEGF 表达显著高于 Wistar-RA 组($P < 0.05$),而 IL-17A 表达显著低于 Wistar-RA 组($P < 0.05$)。**结论** Wistar-RA 模型和 Lewis-RA 模型均出现关节肿胀、变形、活动减少等症状,关节炎指数升高,关节滑膜中 VEGF、IL-6、IL-17A 的表达增加,IL-10 表达下降,与临床相符。但 Wistar-RA 模型肿胀持续时间短,而 Lewis-RA 模型肿胀持续时间长,关节损伤也更为严重,血管新生和血管翳形成更明显;Wistar-RA 模型 IL-17A 表达高,而 Lewis-RA 模型则 VEGF 高表达,这可能与其病理特点有关。

【关键词】 类风湿关节炎;牛 II 型胶原;Wistar 大鼠;Lewis 大鼠;病理特点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0019-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.004

Comparison of pathological characteristics of Wistar and Lewis rat models of collagen-induced rheumatoid arthritis

SHI Jiajun, CHEN Fangming, MA Quaxin, CHEN Cheng, CHEN Jiaojiao, YU Chen, CHEN Minli*

(Institute of Comparative Medicine/Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To study the differences of symptoms and pathological features of Wistar and Lewis rat models of collagen-induced rheumatoid arthritis. **Methods** Wistar and Lewis rats were injected with intermixture of bovine Type II collage and complete Freund's adjuvant (CFA) for first immunization, then strengthen it after 14 days and

【基金项目】 浙江省科技计划项目(2017C37180);浙江中医药大学比较医学创新团队(XTD201301)。

【作者简介】 施佳君(1992—),女,硕士生,研究方向:实验动物与比较药理。E-mail: xsrjsj1992@126.com

【通信作者】 陈民利(1963—),女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@zcmu.edu.cn

observed the incidence of Wistar-RA group and Lewis-RA group. The degree of paws swelling and the titer of serum anti CII antibody were determined. The pathological changes in toe and joint tissues were examined at 12 weeks, and the expressions of VEGF, IL-6, IL-10 and IL-17A in the synovial membrane of ankle joint were detected. **Results** After collagen induction, the Wistar and Lewis rats showed paw swelling after 10 d and 14 d, and peaked at 21 d and 24 d, the titer of serum anti CII antibody was significantly increased at third week ($P < 0.01$), and arthritis index (AI) was also significantly increased ($P < 0.01$). In the Wistar-RA rat group, the rate of molding was 80%, and at fifth weeks, the swelling of the paws subsided and went into a flat level. The molding rate of the Lewis-RA group was 100%, at the seventh week, the swelling of paws subsided and went into a flat level. At 12 weeks, the two model groups showed severe articular cartilage erosion, synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration, neovascularization and pannus formation in the joint synovium, and the bone mineral density of the femur and tibia of the hind limbs was significantly decreased ($P < 0.01$). The expression of VEGF, IL-6 and IL-17A in synovium was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of IL-10 was obviously decreased ($P < 0.01$). Compared with the Wistar-RA group, the paw volume and paw thickness were increased for a longer time in the Lewis-RA group, AI was higher than that of the Wistar-RA group, synovial angiogenesis and pannus formation were more distinct, the expression of VEGF in synovium was significantly higher than that of Wistar-RA group ($P < 0.05$), while the expression of IL-17A was significantly lower than that in the Wistar-RA group ($P < 0.05$). **Conclusions** Both the Wistar-RA rat model and Lewis-RA rat model show joint swelling, deformation and decreased activity. AI is increased, the expression of VEGF, IL-6 and IL-17A increased, and the expression of IL-10 decreased, which are consistent with the clinical manifestation. The Wistar-RA rat model has a short duration of swelling, while the Lewis-RA rat model has a longer swelling duration and more severe joint damages. The neovascularization and pannus formation are more obvious. The expression of IL-17A in the Wistar-RA rat model is higher, while the Lewis-RA model has a highly expressed VEGF, which may be related to its pathological characteristics.

[Key words] rheumatoid arthritis; bovine type II collagen; Wistar rat; Lewis rat; pathological characteristics

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、炎症性、系统性的自身免疫性疾病,其主要的病理学特征为关节滑膜组织增生以及骨、软骨等结构进行性病变,最终导致关节畸形,功能丧失,严重影响人们的生活质量^[1]。动物模型是研究 RA 发病机制和防治方法的重要环节。牛 II 型胶原诱导啮齿类动物形成胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)为常用的 RA 模型,尤其在药效学评价研究中大鼠 CIA 模型使用最多,国际上大多使用 Lewis 大鼠造模^[2-3],而国内大多用 Wistar 大鼠造模^[4-5]。我们在前期研究工作中虽也发现 Lewis 大鼠和 Wistar 大鼠在成模率和对胶原的敏感性上有差异,但这两种模型在病症表现和病理特点上的差异尚不清楚。为此,本研究对胶原诱导的 Wistar 和 Lewis 大鼠 RA 模型的病症病理特点进行了比较研究,为大鼠 RA 模型动物的选择应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠与 Lewis 大鼠各 16 只,体重为 (170 ± 10) g,购自北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2012-0001];饲养于浙江中医

药大学动物实验研究中心屏障环境实验室[SYXK(浙)2013-0184];环境温度 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$;相对湿度 50%~65%;光照 12 h 明暗交替(早 7:30~晚 19:30);噪音: <50 dB。大鼠饲养于 IVC 中,每笼 3 只饲养,自由饮食;试验期间,遵循 3R 原则给予实验动物人道主义关怀,福利伦理审查证号[ZSLL-2016-84]。

1.2 主要试剂及仪器

牛 II 型胶原(CII)(20021)购自 Chondrex 公司;弗氏完全佐剂(CFA)(F5881)、弗氏不完全佐剂(IFA)(F5506)、一抗 VEGF(sc-7269)等购自 Santa Cruz 公司;IL-6(ab9324)、IL-10(ab33471)和 IL-17(ab214588)等购自 Abcam 公司;二抗:PV-8000 通用型二抗试剂盒(含 DAB 显色液)购自中杉金桥公司;HRP 标记兔抗大鼠二抗(BA1058)购自 BOSTER 公司;TMB 底物溶液(J644)购自 Amresco 公司;苏木色精(M0820)购自上海伯奥生物科技有限公司;曙红 Y 水溶(71014544)购自国药集团化学试剂有限公司。

YLS-7C 足趾容积测量仪(山东济南益延科技有限公司);电子数显游标卡尺(Exploit 公司);多功能酶标仪(赛默飞世尔科技公司);PLX7000B 高频

C 臂 X 射线系统(南京 Perlove 医疗设备公司);ASP200S 全自动脱水机(Leica 公司);AP280-2 包埋机(Microm 公司);半自动切片机(Leica 公司);NanoZoomer 数字切片扫描仪(滨松光子公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫原的制备

4℃ 无菌条件下,将 CII 冻干粉溶解于 0.05 mol/L 乙酸溶液中,配制浓度为 2 mg/mL,与等体积的 CFA 或 IFA 充分混匀乳化(即每 1 mL 含 1 mg CII),采用注射器双推 20 min,现配现用。

1.3.2 动物分组与造模

取 Lewis 和 Wistar 大鼠各 6 只为 Lewis 正常对照组、Wistar 正常对照组,其余各 10 只尾根部皮内注射 CII 和 CFA 的 1:1 乳化混合液进行首次免疫,其中,Lewis 大鼠每只注射 0.3 mL,Wistar 大鼠每只注射 0.4 mL;第 14 天加强免疫,均注射 CII 和 IFA 的 1:1 乳化混合液每只 0.2 mL,建立 Lewis-RA 模型和 Wistar-RA 模型,即为 Lewis-RA 组和 Wistar-RA 组。每日观察各组的发病情况,每周测定各组大鼠足肿胀程度,每隔 3 周评估关节炎指数,并测定关节炎血清抗 CII 抗体效价,第 12 周时进行 X 射线检查和组织病理学观察。

1.3.3 一般情况观察

观察各组大鼠的行为活动、精神状态、发病等情况,并记录发病时间和发病数量计算发病率。

1.3.4 关节肿胀和变形情况观察

每周称取大鼠体重,并测定各组大鼠后足的足容积和足掌厚度,测定后足容积时将每只大鼠后足踝关节上 0.5 cm 处做好标记,测量时使该标记与足趾容积测量仪的浴槽水平面齐平,通过排水法测算出足容积,计算左右后足足容积的平均值和足容积增长率($\frac{\text{每周足容积} - \text{第 1 周足容积}}{\text{第 1 周足容积} \times \text{体重}} \times 100\%$)。测定各组

大鼠后足的足掌厚度时用游标卡尺测定足掌肿胀最大处的厚度,计算左右后足足掌厚度的平均值和足掌厚度增长率($\frac{\text{每周足掌厚度} - \text{第 1 周足掌厚度}}{\text{第 1 周足掌厚度} \times \text{体重}} \times 100\%$),并于第 3 周、6 周、9 周、12 周进行关节炎指数(AI)评分。AI 评分规则如下:0 分,正常;1 分,足部出现可见的轻微红肿(肿胀区域限于掌心或踝关节);2 分,脚踝至脚掌出现明显的红肿;3 分,整个脚掌红肿并累及脚趾;4 分,严重的肿胀并出现关节变形,不能负重^[6]。四个肢体评分相加得到 AI 总分。首次免疫后第 12 周各组大鼠腹腔注射 3% 戊

巴比妥钠 45 mg/kg 进行麻醉,俯卧位进行 X 射线影像学检查,设定 X 射线参数为 54 kV、0.6 Am。

1.3.5 病理学观察

观察结束后,各组大鼠实施过量麻醉安死术,沿后肢正中纵行切开皮肤直至暴露出膝关节,从膝关节囊上缘向上 1 cm 处剪断下肢,分离剥除肌肉,迅速放入福尔马林固定。固定 72 h 后,关节置 10% 甲酸中脱钙 4 周,待针刺骨组织无阻力感时即为脱钙完成,进行常规的脱水包埋后切成 4 μm 的薄片,行苏木素-伊红(HE)染色观察其病理变化。

1.3.6 免疫学相关指标的测定

每隔 3 周,眼眶取血 0.6 mL,3000 r/min 离心 10 min,取其上清,−80℃ 冰箱保存,用于检测血清中抗 CII 抗体效价。

采用免疫组化染色方法检测踝关节相关免疫因子的表达。蜡块切成 4 μm 的薄片,60℃ 烘烤 2 h,脱蜡,水洗,经高压修复后用 3% 的过氧化氢溶液封闭 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,然后滴加 VEGF、IL-6、IL-10 和 IL-17 抗体稀释液于 4℃ 孵育过夜,经 PBS 冲洗后滴加二抗,37℃ 孵育 1 h,DAB 显色,苏木素复染,透明后封片。目标蛋白被标记为棕黄色。用 NanoZoomer 数字切片扫描仪扫描切片,并用图像软件截取 20 × 的照片,用 IPP6.0 软件分析其阳性表达光密度(IOD)。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有数据以平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,计量资料应用 ANOVA 方差分析评价试验结果,两两比较采用 LSD 检验,等级资料应用秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 一般观察情况

Lewis 和 Wistar 大鼠的正常对照组均饮食正常,精神状态良好,动作敏捷,四肢有力。Wistar-RA 组有 8 只大鼠在首次免疫后第 10 天出现活动减少,精神萎靡,毛发粗乱,轻微脱毛,足掌部肿胀明显,第 21 天肿胀达到高峰,随后肿胀缓慢消退并从第 5 周进入平缓期,其余 2 只未见足掌肿胀,Wistar-RA 组的成模率为 80%。Lewis-RA 组 10 只大鼠均在首次免疫后第 14 天出现脚掌和踝关节肿胀,第 24 天肿胀达到高峰,随后肿胀消退,第 8 周进入平缓期,Lewis-RA 组的成模率为 100%,且脚趾和关节变形

严重,尾部有结痂。由表 1 可见,第 3 周、6 周、9 周、12 周时 Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组关节炎指数均显著升高($P < 0.01$),第 6 周后 Lewis-RA 组关节炎指数均高于 Wistar-RA 组($P < 0.05$),且随着时间的延长,个体差异减少。

2.2 足容积和足掌厚度

由图 1 显示,与 Lewis 正常对照组比较, Lewis-RA组首次免疫后第 2 周至 12 周足容积、足掌厚度和足容积增长率、足掌厚度增长率均显著增加($P < 0.01$),足容积曲线和足容积增长率曲线在第 3 周达到高峰,随后曲线逐渐下降,第 8 周后曲线变平;足掌厚度曲线和足掌厚度增长率曲线也在第 3 周达到高峰,随后曲线下降,在第 7 周后曲线变平。

而图 2 显示,与 Wistar 正常对照组比较, Wistar-RA 组第 2 周至 12 周足容积、足掌厚度和足容积增长率、足掌厚度增长率均显著增加($P < 0.01$),且足容积曲线、足掌厚度曲线和足容积增长率曲线、足掌厚度增长率曲线均在第 3 周达到高峰,在第 5 周后曲线变平。

2.3 血清抗 CII 抗体效价水平

由图 3 可见,与正常对照组比较, Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组血清抗 CII 抗体效价均显著升高($P < 0.01$);与 Wistar-RA 组比较,首次免疫后 6 周、9 周和 12 周时 Lewis-RA 组血清抗 CII 抗体效价均明显低于 Wistar-RA 组大鼠($P < 0.01$)。

表 1 Wistar 和 Lewis 大鼠 RA 模型关节炎指数 (AI) 评分比较

Tab.1 Comparison of arthritis indexes (AI) between the Wistar and Lewis rat RA models

组别 Groups	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks	9 周 9 weeks	12 周 12 weeks
Wistar 正常对照组 Wistar control group	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Wistar-RA 组 Wistar-RA group	7.43 ± 0.78 ^{##}	8.57 ± 1.32 ^{##}	12.14 ± 1.60 ^{##}	12.29 ± 1.32 ^{##}
Lewis 正常对照组 Lewis control group	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Lewis-RA 组 Lewis-RA group	9.00 ± 1.84 ^{##}	14.67 ± 0.52 ^{##*}	15.17 ± 0.37 ^{##*}	15.67 ± 0.20 ^{##*}

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 Wistar-RA 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$. Compared with the Wistar-RA group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$.

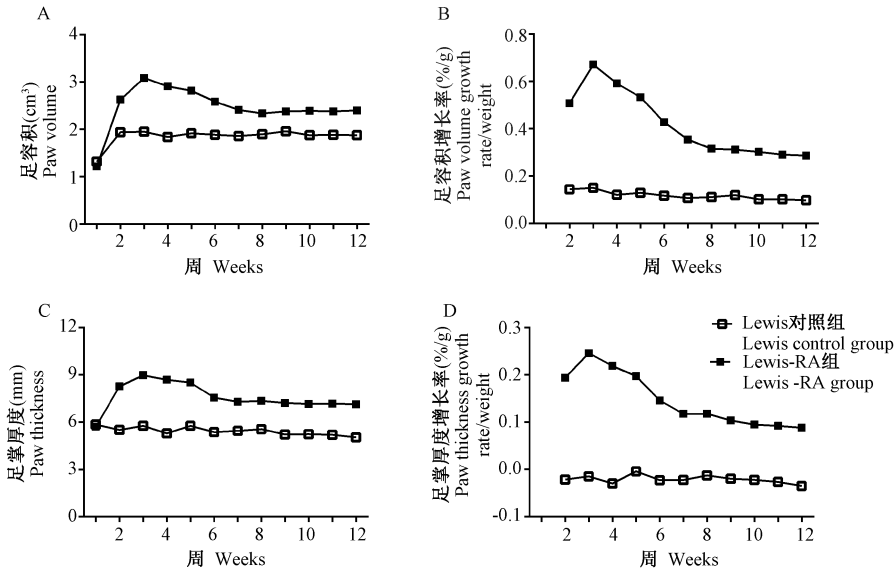


图 1 Lewis 大鼠足容积和足掌厚度

Fig.1 The paw volume and paw thickness of the Lewis rats

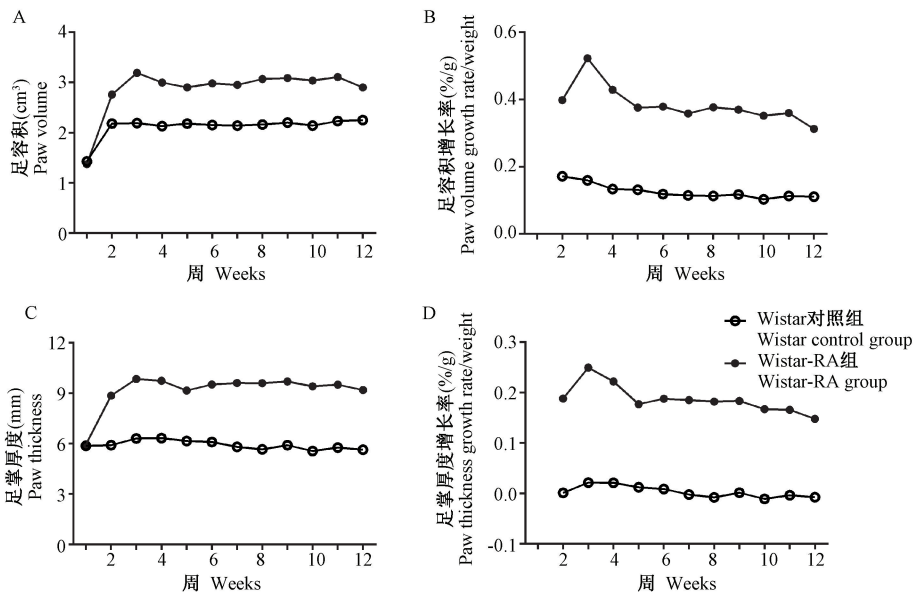
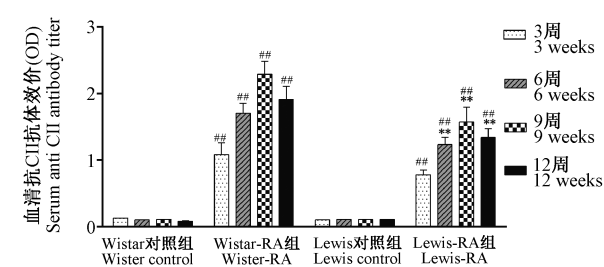


图2 Wistar大鼠足容积和足掌厚度

Fig. 2 The paw volume and paw thickness of the Wistar rats



注:与正常对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Wistar-RA 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 血清抗 CII 效价抗体水平

Note. Compared with the control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with the Wistar-RA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

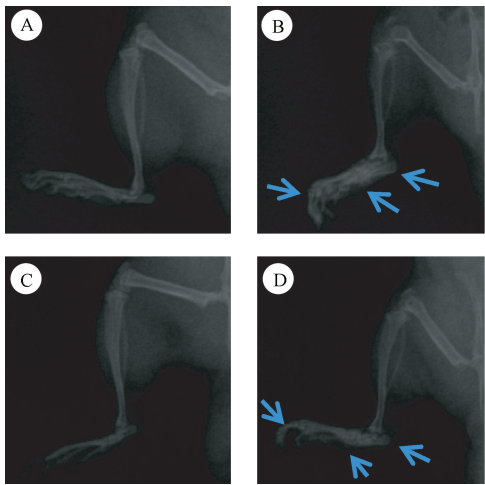
Fig. 3 Serum anti-CII antibody titers in the rats

2.4 后肢足关节形态和骨密度

由图 4 后肢 X 光片检查结果显示, Lewis 和 Wistar 大鼠的正常对照组关节结构完整清楚, 足趾各关节空隙清晰, 均未见踝关节软组织肿胀。Lewis-RA 组和 Wistar-RA 组均出现踝关节软组织肿胀, 足趾各关节空隙狭窄且模糊, 关节变形等病变。与 Wistar-RA 组比较, Lewis-RA 组的足趾关节肿胀和骨质损伤更严重。图 5X 光片的骨密度分析结果显示, 与正常对照组相比 Lewis-RA 组和 Wistar-RA 组股骨和胫骨骨密度均明显降低 ($P < 0.01$), 但两模型组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.5 踝关节常规病理组织学观察

HE 染色结果显示, Lewis 和 Wistar 正常对照组大鼠踝关节结构清晰, 脂肪性滑膜和纤维性滑膜未



注: A: Wistar 正常对照组; B: Wistar-RA 组; C: Lewis 正常对照组; D: Lewis-RA 组; “→”表示肿胀变形严重。

图4 后肢足关节形态

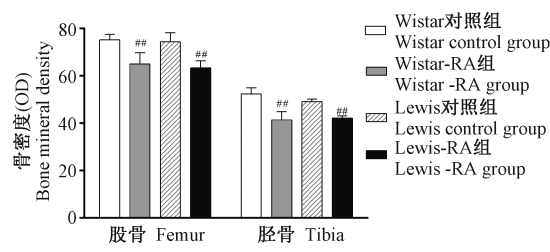
Note. A: Wistar control group. B: Wistar-RA group. C: Lewis control group. D: Lewis-RA group. “→” indicates serious swelling and deformation.

Fig. 4 Radiological images of the rat hind limb joints

见明显增生, 软骨完整, 未见炎症细胞浸润。两模型均出现软骨侵蚀, 滑膜增生, 大量炎症细胞浸润, 破骨细胞增多, 侵蚀、溶解全层骨组织, 并有血管翳形成。与 Wistar-RA 组比较, Lewis-RA 组软骨层破坏更严重、血管翳形成更多(图 6)。

2.6 关节滑膜细胞因子的表达

免疫组化显示, 与 Wistar 和 Lewis 大鼠的正常对照组比较, Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组大鼠踝关



注:与正常对照组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{*}*P < 0.01$;与 Wistar-RA 组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{*}*P < 0.01$ 。

图 5 后肢骨密度分析

Note. Compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{*}*P < 0.01$. Compared with the Wistar-RA group, $^{*}P < 0.05$, $^{*}*P < 0.01$.

ig. 5 Analysis of the bone mineral density of the rat hind limbs

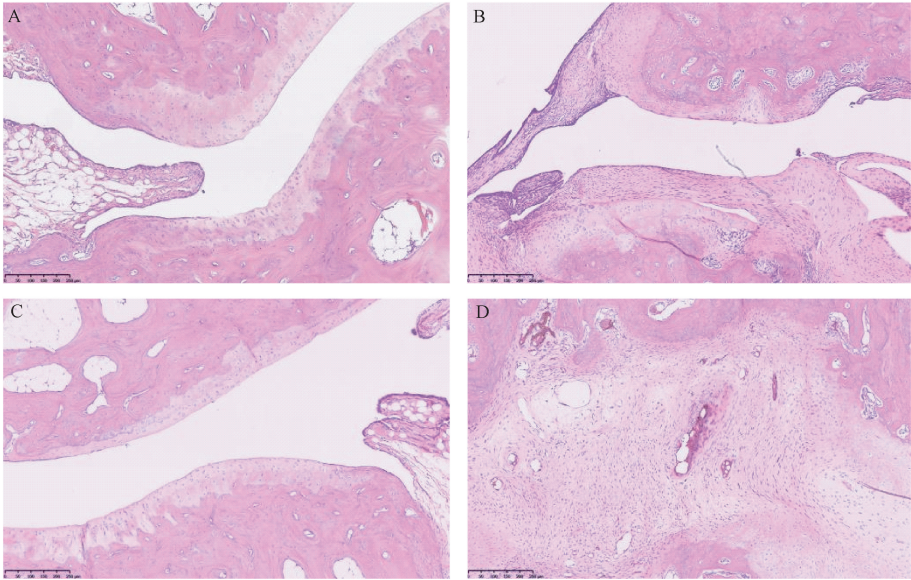
节滑膜中 VEGF、IL-6、IL-17A 的表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), IL-10 表达明显降低 ($P < 0.01$)。与 Wistar-RA 组比较, Lewis-RA 组 VEGF 表达显著高于 Wistar-RA 组 ($P < 0.05$), IL-17A 则显著低于 Wistar-RA 组 ($P < 0.05$), 而 IL-6、IL-10 的表达则无明显差异 ($P > 0.05$) (图 7、图 8)。

3 讨论

牛 II 型胶原 (CII) 诱导大鼠 RA 模型中, 常用造模的首次免疫剂量为每只 0.2 ~ 0.4 mg^[7-8], 加强免疫剂量为每只 0.2 mg, 其中, Lewis 大鼠造模的首次免疫剂量以每只 0.2 mg 或 0.4 mg 居多^[9-10], 而 Wistar 大鼠造模的首次免疫剂量以每只 0.4 mg 居

多^[5,11]。我们前期研究曾在 Lewis 大鼠造模中使用 CII 首次免疫注射剂量每只 0.4 mg, 发现免疫后注射部位尾根部出现溃烂断裂。本实验中, 将 Lewis 大鼠造模的 CII 首次免疫剂量改为每只 0.3 mg, 虽也出现尾部有结痂, 但未见尾根部溃烂断裂; Lewis 大鼠首次免疫后第 14 天出现肿胀, 第 24 天达到高峰, 随后肿胀逐渐消退, 第 7 周进入平缓期, 其成模率为 100%, 与文献描述一致^[12]; Wistar 大鼠造模使用 CII 的首次免疫剂量为每只 0.4 mg, 首次免疫后分别在第 10 天出现肿胀, 第 21 天达到高峰, 随后肿胀消退, 第 5 周进入平缓期, 成模率 80%。足容积、足掌厚度测定结果也发现, Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组足容积、足掌厚度均都在第 3 周达到高峰, 随后逐渐下降, Wistar-RA 组的足容积、足掌厚度在第 5 周后稳定在一定程度, 而 Lewis-RA 组足容积、足掌厚度分别在第 8 周和第 7 周后稳定在一定程度, 与 Wistar-RA 组比, Lewis-RA 组的关节肿胀持续时间长 2 ~ 3 周。说明 CII 诱导后, Wistar 大鼠肿胀出现快, 但消退也快, 肿胀的持续时间较短; 而 Lewis 大鼠肿胀出现慢, 但消退更慢, 肿胀的持续时间长。且 AI 评分结果显示, Lewis-RA 组 AI 第 6 周后明显高于 Wistar-RA 组, 说明 Lewis-RA 组的关节损伤程度大于 Wistar-RA 组, 这可能与 Lewis-RA 的关节肿胀的持续时间有关。

类风湿关节炎会导致关节软骨、骨组织结构破

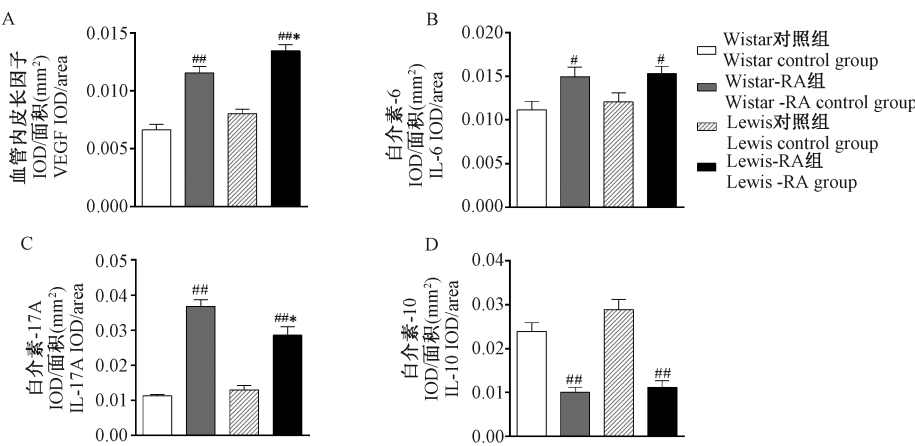


注: A: Wistar 正常对照组; B: Wistar-RA 组; C: Lewis 正常对照组; D: Lewis-RA 组。

图 6 HE 染色观察结果 (Bar = 250 μm)

Note. A: Wistar control group; B: Wistar-RA group; C: Lewis control group; D: Lewis-RA group.

Fig. 6 Histology of the articular bone and cartilage tissues of the rats. HE staining



注：与正常对照组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与 Wistar-RA 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 7 关节滑膜 VEGF、IL-6、IL-10、IL-17A 的表达

Note. Compared with the control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the Wistar-RA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 7 Expression of VEGF, IL-6, IL-10, IL-17A in the synovial tissues

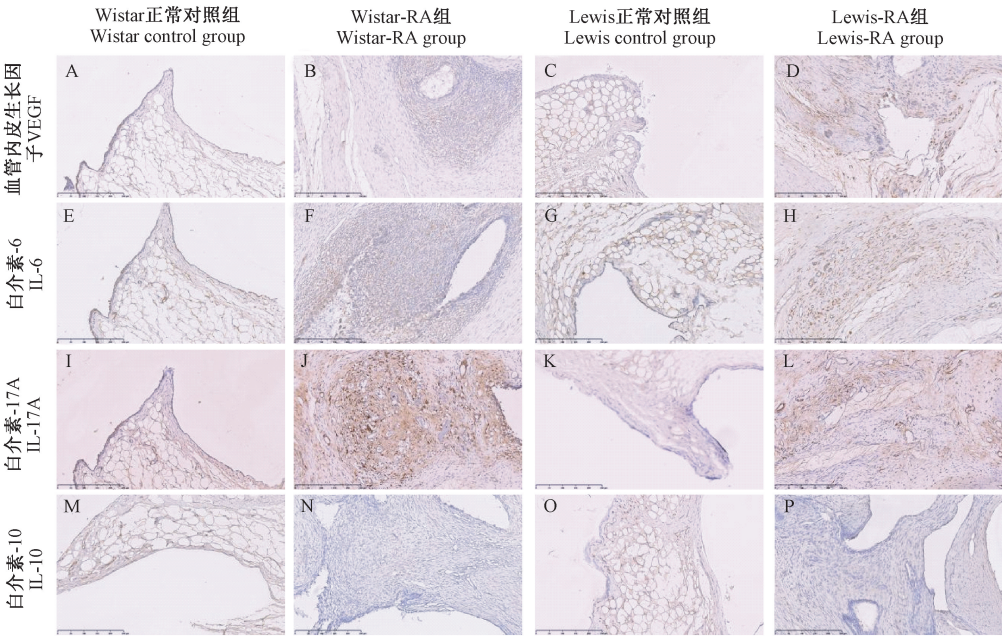


图 8 踝关节 VEGF、IL-6、IL-17A、IL-10 免疫组化结果 (Bar = 250 μm)

Fig. 8 Expression of VEGF, IL-6, IL-17A and IL-10 in the ankle tissues. Immunohistochemical staining

坏以及功能障碍，也是继发骨质疏松的重要原因^[13]。后肢 X 光片检查结果发现，Lewis-RA 组和 Wistar-RA 组均出现踝关节软组织肿胀，足趾各关节空隙狭窄且模糊，关节变形等病变。但 Lewis-RA 组的足趾各关节肿胀和骨质损伤更严重。且对 X 光片的骨密度分析结果发现，Lewis-RA 组和 Wistar-RA 组股骨和胫骨骨密度均明显降低 ($P < 0.01$)，说明 Lewis-RA 和 Wistar-RA 已出现了骨质疏松的症状。组织病理学观察发现，Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组

大鼠踝关节均出现了滑膜增生、血管翳形成，软骨破坏和骨侵蚀等典型的 RA 症状，且 Lewis-RA 组大鼠的软骨破坏更严重，血管新生和滑膜血管翳形成更多，这说明 Lewis 大鼠的关节损伤更为严重。

CII 抗体免疫应答与 RA 关节的系统性受累以及持续的慢性发展有着紧密联系。本实验结果显示 Lewis-RA 组大鼠的血清抗 CII 抗体效价低于 Wistar-RA 组大鼠，这可能与 Lewis 大鼠 CII 的首次免疫剂量低于 Wistar 大鼠有关。然而从发病率来

看,X光片和组织病理学观察结果表明 Lewis 大鼠的关节损伤更严重,这可能与 Lewis 大鼠自身遗传的生理特性有关。Lewis 大鼠先天的下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal,HPA)轴功能低下^[14-15],免疫亢进,易感类风湿关节炎和实验性脑脊髓炎等自身免疫性疾病^[16],说明 Lewis 大鼠更易诱导形成类风湿关节炎模型。

慢性炎症反应是 RA 的主要发病机制,淋巴细胞浸润及其分泌促炎因子和抗炎因子之间的相互作用和调节,形成复杂的调控网络,控制着关节炎的发生和发展^[17]。IL-17A 是具有强大致炎作用的促炎细胞因子,能促进成纤维细胞分泌 IL-6、IL-8、GM-CSF 等炎症因子,并能刺激破骨细胞分化和活化,是导致滑膜炎、骨破坏的重要因素^[18-19]。IL-6 在骨的新陈代谢中诱导破骨细胞前体分化成真正的破骨细胞,是进一步破坏骨和软骨的主要因素,IL-6 水平与慢性滑膜炎的局部关节症状及关节破坏的严重程度密切相关^[20]。IL-6 可提高 VEGF 的水平,VEGF 作为血管新生的重要诱导剂,对 RA 滑膜炎和滑膜血管翳的形成具有重要作用^[21]。IL-10 是一种抗炎性因子,在类风湿关节炎的发病中起一定作用,中和 IL-10 后关节炎加重^[22]。本实验结果显示,Wistar-RA 组和 Lewis-RA 组踝关节滑膜中 VEGF、IL-6、IL-17A 的表达显著增加,而 IL-10 表达明显降低,表明在 Wistar-RA 模型和 Lewis-RA 模型的病理过程与 VEGF、IL-6、IL-17A 和 IL-10 的表达密切相关。实验结果还显示,Lewis-RA 组关节滑膜 IL-17A 表达低于 Wistar-RA 组,而 VEGF 表达则高于 Wistar-RA 组,提示 Wistar-RA 模型中 IL-17A 的促炎作用更强,而 Lewis-RA 模型关节滑膜血管新生和血管翳形成更明显,可能是与 VEGF 的高表达有关。

RA 是一种自身免疫性炎症性疾病,临床表现为关节肿胀、疼痛、变形,其病理是以滑膜持续炎症,骨骼破坏及软骨降解为特征^[23]。炎症细胞因子激活破骨细胞是局部骨破坏的重要原因之一^[24]。本实验通过 CII 诱导建立大鼠 RA 模型,均出现了关节肿胀、变形,活动减少等症状,关节炎指数升高,关节滑膜中 VEGF、IL-6、IL-17A 的表达增加,IL-10 表达下降,与临床的症状表现和病理机制相符。但 Wistar 大鼠模型和 Lewis 大鼠模型的病程、病症和病理特点存在一定的差异。Wistar 大鼠胶原诱导后肿胀出现快,但肿胀的持续时间较短;而 Lewis 大鼠胶

原诱导后肿胀出现慢,但肿胀的持续时间长,Wistar 大鼠造模价格便宜,但成模率低,而 Lewis 大鼠价格高,但成模率 100%,且关节损伤更为严重、血管新生和血管翳形成更明显。因此,对这两种模型的选择需要根据其不同的病征特点以及实验目的综合考虑而定。

参考文献:

- [1] Doan T, Massarotti E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies [J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(7): 751-762.
- [2] Lon HK, Liu D, Zhang Q, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic disease progression model for effect of Etanercept in Lewis rats with collagen-induced arthritis [J]. Pharm Res, 2011, 28(7): 1622-1630.
- [3] Cuzzocrea S, Saadat F, Paola R, et al. Artemether: A new therapeutic strategy in experimental rheumatoid arthritis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2005, 27(4): 615-630.
- [4] 王威, 翟华强, 李睿, 等. 海蛇药酒联合甲氨蝶呤对胶原诱导关节炎大鼠血清 CD4/CD8 及 IgA、IgM、IgG 的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(11): 2221-2224.
- [5] 田新玮, 刘春景, 王学涵, 等. 蓬草除痹汤对 II 型胶原蛋白诱导性关节炎大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 及 PGE₂ 影响的实验研究 [J]. 河南中医, 2011, 31(2): 138-140.
- [6] 易剑峰, 汤响林. 芍药苷对胶原诱导型关节炎大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 668-672.
- [7] 李艳玲, 祁芳, 许明, 等. 常用类风湿关节炎动物模型研究概况及展望 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(4): 63-66.
- [8] 刘佳维, 李艳彦, 王永辉. 类风湿关节炎的实验动物模型研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2016, 16(64): 35-36.
- [9] Clark AK, Grist J, Al-Kashi A, et al. Spinal cathepsin S and fractalkine contribute to chronic pain in the collagen-induced arthritis model [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 2038-2047.
- [10] Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, et al. Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(12): 2909-2921.
- [11] 黄颖, 姚血明, 唐芳, 等. 艾拉莫德对胶原诱导性关节炎大鼠模型的抗炎作用 [J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(3): 5-7.
- [12] 陈程, 黄光辉, 黄豆豆, 等. 类风湿关节炎啮齿类实验动物模型的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 428-434.
- [13] 刘海. 类风湿性关节炎并发骨质疏松患者骨密度、骨代谢指标与血清 IL-17、MMP-9 水平的关系 [J]. 河北医药, 2015, 37(17): 2576-2579.

(下转第 37 页)

- [3] 易清华, 凌晨荣, 陈克明, 等. 围绝经期妇女子宫良性疾病行子宫切除术同时切除双侧输卵管的临床应用价值探讨 [J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 110-114.
- [4] 田树红, 王日超, 邢桂兰, 等. 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 239-242, 247.
- [5] 荆喜中, 贾欢欢, 罗挺, 等. 小鼠腺毒症模型的建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 158-163.
- [6] Qin F, Du DF, Li XL. The effect of salpingectomy on ovarian reserve and ovarian function [J]. Obstet Gynecol Surv, 2016, 71(6): 369-376.
- [7] Singha A, Saha S, Bhattacharjee R, et al. Deterioration of ovarian function after total abdominal hysterectomy with preservation of ovaries [J]. Endocr Pract, 2016, 22(12): 1387-1392.
- [8] 丁森君, 路俊兰, 张慧女. 子宫肌瘤子宫全切术后患者卵巢内分泌功能的变化与研究 [J]. 中国性科学, 2015, 24(1): 26-28.
- [9] 涂蛟, 肖雁冰, 曹丽, 等. 全子宫与次全子宫切除术治疗子宫肌瘤对女性卵巢功能的影响 [J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(4): 278-281.
- [10] Sezik M, Ozkaya O, Demir F, et al. Total salpingectomy during abdominal hysterectomy: effects on ovarian reserve and ovarian stromal blood flow [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2007, 33(6): 863-869.
- [11] Tapisiz OL, Gungor T, Aytan H, et al. Does hysterectomy affect ovarian function? Histopathologic evaluation and serum FSH, inhibin A, and inhibin B levels in an experimental rat model [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008, 140(1): 61-66.
- [12] Hildebrandt BA, Racine SE, Keel PK, et al. The effects of ovarian hormones and emotional eating on changes in weight preoccupation across the menstrual cycle [J]. Int J Eat Disord, 2015, 48(5): 477-486.
- [13] Leeners B, Geary N, Tobler PN, et al. Ovarian hormones and obesity [J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(3): 300-321.
- [14] Brown LM, Gent L, Davis K, et al. Metabolic impact of sex hormones on obesity [J]. Brain Res [J]. 2010, 1350: 77-85.
- [15] Frank A, Brown LM, Clegg DJ. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation [J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35(4): 550-557.
- [16] Campello RS, Fátima LA, Barreto-Andrade JN, et al. Estradiol-induced regulation of GLUT4 in 3T3-L1 cells: involvement of ESR1 and AKT activation [J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(3): 257-268.

[收稿日期]2017-10-20

(上接第 26 页)

- [14] Sternberg EM, Young WS, Bernardini R, et al. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(12): 4771-4775.
- [15] Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(7): 2374-2378.
- [16] 卢晔芬, 郑荣远. 神经内分泌免疫网络与实验性变态反应性脑脊髓炎的关系 [J]. 中国临床神经科学, 2006, 14(4): 435-439.
- [17] 李冰, 刘军, 肖瑜, 等. 抗炎症因子与类风湿性关节炎关系的研究进展 [J]. 天津医药, 2016, 44(8): 1053-1056.
- [18] Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells [J]. Semin Immunol, 2007, 19(6): 383-393.
- [19] 高薇, 鲁静, 赵丽娟. 炎症细胞因子与类风湿关节炎 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(4): 450-453.
- [20] 苗平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 355-360.
- [21] 程琦, 宋文刚, 王宁, 等. 类风湿性关节炎滑膜组织中 VEGF 表达及临床意义 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(25): 70-71.
- [22] 安新, 高利常, 刘白鹭. 类风湿关节炎患者血清 MMP-13、sICAM-1、IL-10 检测的临床意义 [J]. 现代免疫学, 2014, 34(1): 52-55.
- [23] 寇永锋, 赵新秀. 类风湿性关节炎临床证型研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 835-837.
- [24] 赵晓菲, 安高, 郭亚春, 等. 细胞因子在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(1): 53-56.

[收稿日期]2017-09-25